

剑尾鱼脑细胞系的建立及细胞色素 P4501A 的诱导表达

王英英, 李凯彬, 刘 春, 王 庆, 曾伟伟, 石存斌, 吴淑勤*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部渔用药物创制重点实验室,
广东省免疫技术重点实验室,广东 广州 510380)

摘要: 为了构建剑尾鱼脑细胞系并探讨其细胞色素 P4501a(CYP1A)基因的诱导效应,实验通过胰蛋白酶消化法对剑尾鱼脑组织进行体外培养,经连续继代培养,建立了可稳定传代的脑细胞系,命名为 SFB。SFB 最适培养液为含有 15% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F-12 和 L-15 等比混合培养液,培养条件为 27 °C,5% CO₂。生长特性研究表明,第 65 代细胞的群体倍增时间为 43.048 h,显示出旺盛的生长和分裂能力。染色体分析发现,培养细胞的染色体众数为 48 条,SFB 核型公式为 $2n = 2st + 46t$,臂指数(NF) = 48,与剑尾鱼一致。诱导实验表明,SFB 在 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 的苯并(a)芘诱导下,CYP1A mRNA 表达量显著提升,且表现出良好的剂量效应关系。脑细胞系的建立为剑尾鱼的毒理学评价研究提供了便利,也为其系统的生态毒理学应用打下基础。

关键词: 剑尾鱼; 脑细胞系; 细胞色素 P4501A

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

目前,鱼类细胞作为毒理学研究和环境污染物评估的工具颇受关注^[1-2],与体内试验比较,以鱼类细胞系为代表的体外研究体系具均一性好、反应条件易于控制、与污染物作用直接等特点,且可减少生物体自我排毒等整体效应的影响,保证了研究的可重复性。作为污染物检测以及毒理学研究的优良体外系统,细胞系已发展成为一种获普遍认可的检验技术,在污染物毒性评价及毒理学研究中发挥重要作用。

鱼类终生生活于水中,在污染物环境毒性评价及效应研究应用中具明显优势,剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)是其中的优秀代表之一,分布于墨西哥和危地马拉等地,具有体型小,繁殖周期短,易饲养等特点,且对一些环境污染物敏感,已被推荐作为一种生态毒理学测试的模式实验动物^[3-4]。国内外至今还未见剑尾鱼细胞系体外检测环境污染物的研究报道。因此,剑尾鱼相关细胞系的建立对其在生态毒理研究中的系统应用有重要意义。

细胞色素 P450 酶是机体参与有机污染物代谢的重要酶系,在机体解毒中起重要作用,是污染物早期毒性评价的优良指标。鱼类细胞系经长期的继代培养,细胞功能趋于特化,可能导致某些主要功能的丧失。研究表明,许多鱼类细胞系已不具备表达细胞色素 P450 酶的功能,使其在有机污染物评价应用中大打折扣。本实验采用胰蛋白酶消化培养方法,获得可稳定传代的剑尾鱼脑细胞系(SFB),研究发现,持久性有机污染物可明显诱导细胞色素 P4501A(CYP1A)基因的表达,且表现出良好的剂量-效应关系。因而,剑尾鱼脑细胞系或可作为体外毒理学细胞模型应用于持久性有机污染物的毒理学相关研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胰蛋白酶、DMEM/F-12、L-15、DMEM、Medium199(M199)培养基均为 Gibco 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)为 Sigma 公司产品;双抗、

收稿日期:2012-10-30 修回日期:2012-12-23

资助项目:国家自然科学基金项目(40976072);国家科技支撑计划(2012BAD25B02)

通信作者:吴淑勤,E-mail:wushuqin001@21cn.com

HBSS、胎牛血清(FBS)为 Hyclone 公司产品;秋水仙素为 Fluka 公司产品。其他试剂为国产分析纯。

1.2 主要仪器

正置显微镜(E200)为 Olympus 公司产品,倒置荧光显微镜(TS100)为 Nikon 公司产品;超净工作台为海尔公司产品,血细胞计数板为上海精密仪器公司产品,CO₂培养箱为 Thermo 产品。

1.3 剑尾鱼脑细胞的原代培养

细胞培养采用胰酶消化法。取鲜活剑尾鱼(体质量 5~7 g)于 75%酒精中浸泡 1~2 min,无菌取出脑组织,HBSS 漂洗 2 次,置于 5 mL 的无菌青霉素小瓶中,加入 0.5 mL HBSS,用手术剪将其剪成约 1 mm³ 碎块,加入 5 mL HBSS 收集至 15 mL 离心管,1 000 r/min 离心 3 min,去上清液,并重复一次。约 10 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶室温下消化组织块 20 min,加入培养液终止消化,用 200 目尼龙纱网过滤至新的一次性培养皿中,加入 5 mL 细胞培养液冲洗纱网再过滤一次,将过滤液收集至 15 mL 离心管中,离心去上清液。用含 20% FBS 的 DMEM/F-12 + L-15(1:1)细胞培养液悬起细胞,并接种于 25 cm² 的培养瓶中,于 27 °C,5% CO₂ 的条件下进行培养。

1.4 剑尾鱼脑细胞的培养

细胞传至 15 代时,分别用含浓度为 5%、10%、15%、20% 的 FBS 培养液调整细胞密度为 5 × 10⁴/mL,按 2.5 mL/孔的量接种于 6 孔板,于 27 °C,5% CO₂ 的培养箱中培养,进行最适 FBS 浓度的选择试验;细胞传至 20 代时,分别用含 10% FBS 的 M199、DMEM/F-12、L-15 和 DMEM/F-12 + L-15(1:1)培养液调整各瓶的细胞密度为 5 × 10⁴/mL,按 2.5 mL/孔的量接种于 6 孔板,于 27 °C,5% CO₂ 的培养箱中培养,进行最适培养基的选择试验;将细胞继代培养至第 60 代后,调整细胞浓度为 5 × 10⁴ m/L,按 2.5 mL/孔的量接种至六孔板中,置 5% CO₂ 培养箱中 27 °C 培养,进行生长曲线试验。

每天取 3 个孔细胞,胰酶消化消化制成细胞悬液,混匀后用细胞计数仪进行计数,每项实验重复 3 次,连续进行 1 周,以培养时间(d)为横坐标,细胞浓度(/mL)为纵坐标,绘制生长曲线;根据公式 $T = t \times \text{Lg}2 / \text{Lg}(N_t / N_0)$ 计算细胞的群体倍增时间,其中, N_0 为接种细胞数, N_t 为时间 t 后的

细胞数。

1.5 剑尾鱼脑细胞的染色体分析

第 65 代剑尾鱼脑细胞于对数生长期加入终浓度为 20 μg/mL 的秋水仙素,27 °C 处理 4 h 后收集细胞,用 0.075 mol/L 的 KCl 低渗处理 25 min,加入 1 mL 预冷的卡诺固定液,1 000 r/min 离心 5 min 去上清后,用预冷的卡诺固定液固定 3 次,每次 15 min。冷滴片法滴片,干燥后,用 5% 的 Giemsa 染色 25 min。镜检,选择 160 个分裂相进行核型分析和统计。

1.6 苯并(a)芘对剑尾鱼脑细胞 CYP1A mRNA 表达的影响

第 60 代剑尾鱼细胞消化,调整至细胞密度为 2 × 10⁵/mL,接种至六孔培养板中,每孔 2.5 mL,预培养 4 h 后进行暴露实验,苯并(a)芘浓度梯度为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L,DMSO 暴露组设为对照组,溶剂的最终浓度不超过培养基体积的 0.1%。暴露时间为 24 h,暴露期间 FBS 为 3%。暴露实验结束后,吸弃培养基,提取细胞 RNA,合成 cDNA 模板。目的基因的定量 PCR 引物序列见表 1。

表 1 剑尾鱼 CYP1A 以及内参 β-actin 基因 cDNA 的定量扩增引物

Tab. 1 Primers used for amplification of *X. helleri* CYP1A and β-actin cDNA

基因 gene	引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence
β-actin	βf	TGCTATGTTGCACTGGACTTTGAG
	βr	CCTCTCGTTTCCGATGGTGATGAC
CYP1A	C1f	GCTCTCCGTCATTCTTCATACC
	C1r	GCTTGTGACCTCTGTGCCA

以反转录的 cDNA 为模板,分别以 β-actin 和 CYP1A 基因相对应的引物 βf-βr 和 C1f-C1r 进行荧光定量 PCR 扩增检测。以剑尾鱼 β-actin 作为内参基因。

SYBR Green II 实时荧光定量 PCR 的检测结果由 ABI 7500 Real-Time PCR System 自带软件进行分析,计算方法如下:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(CT_1 - CT_2) - (CT_3 - CT_4)]}$$

式中,CT₁ 为处理样品目的基因的临界循环数,CT₂ 为处理样品管家基因的临界循环数,CT₃ 为对照样品目的基因的临界循环数,CT₄ 为对照样品管家基因的临界循环数,RQ 为处理样品目的

基因经校正后的表达比值 (ratio quantitative), 是最终的定量结果。

1.7 数据处理

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 试验结果表示为平均值 \pm 标准误差, $P \leq 0.05$ 表示处理组与对照组差异显著, $P \leq 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 细胞原代培养及传代培养

在 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$ 条件下, 剑尾鱼脑细胞在培养第 2 天便可观察到细胞贴壁, 2~3 d 后, 贴壁细

胞数目明显增加。原代细胞呈不规则的多角形, 贴壁的细胞多为上皮样细胞形态 (图 1-1), 胞浆透明。培养初期, 细胞之间的界限难以观察清楚。2~3 d 随着细胞的增殖, 细胞边缘逐渐清晰。6 d 后, 生长细胞汇合, 铺满底壁, 并有接触抑制现象。成单层的剑尾鱼脑细胞进行传代后, 大约 3~4 d 便可长满。随传代次数的增加, 细胞的生长速度逐渐加快, 一般 2 d 就要传代一次, 细胞形态发生了变化, 由起初的多角形转变成梭形和短纤维样 (图 1-2, 3, 4), 细胞之间相互连接, 排列整齐紧密。目前, 剑尾鱼脑细胞已传至第 90 代, 细胞状态依然良好。

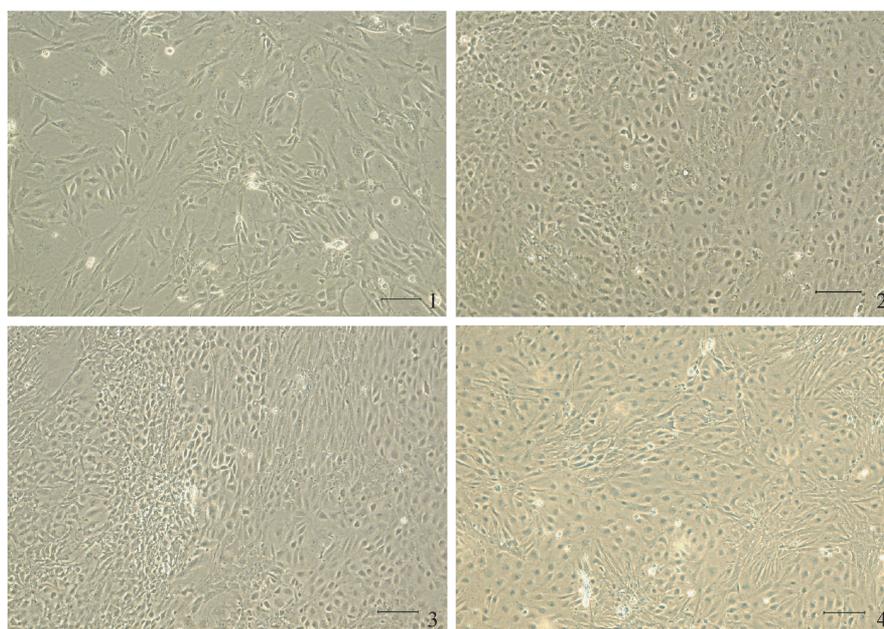


图 1 剑尾鱼脑细胞形态观察 (标尺示 $100\text{ }\mu\text{m}$)

1. 原代细胞; 2. 15^{th} 细胞; 3. 35^{th} 细胞; 4. 65^{th} 细胞。

Fig. 1 Photo micrography of SFB derived from swordtail fish (bar = $100\text{ }\mu\text{m}$)

1. primary cells; 2. 15^{th} cells; 3. 35^{th} cells; 4. 65^{th} cells.

2.2 生长特性

生长初期细胞在 $20\% \text{FBS}$ 条件下生长速度最快, 倍增时间大概为 24 h , 其次是在 $15\% \text{FBS}$ 中, 而细胞在 $5\% \text{FBS}$ 下生长速度非常缓慢 (图 2)。但随着时间的延长, 在 $15\% \text{FBS}$ 中的细胞增殖数量最高, 生长状态最好。

剑尾鱼脑细胞系在选用的 4 种培养液中均能生长, 但生长情况有所差异, 在 $\text{DMEM}/\text{F-12} + \text{L-15}(1:1)$ 培养液中的生长情况优于其他培养液, 而 $\text{DMEM}/\text{F-12}$ 和 L-15 培养液中细胞的生长情况也优于 M199 。在所选的培养基中, 最适合的

培养液是 $\text{DMEM}/\text{F-12} + \text{L-15}(1:1)$ 的混合 (图 3)。

由第 65 代剑尾鱼脑细胞系细胞生长曲线 (图 4) 可以看出, SFB 在接种后的 24 h 内处于迟缓期, 细胞增殖不明显; 自 24 h 后进入对数生长期, 在第 96 小时迅速增殖至最高 ($3.8 \times 10^5/\text{mL}$), 细胞几乎铺满整个底壁; 之后细胞生长进入平稳期和衰退期。第 120 小时后出现较多死亡细胞, 不能在培养瓶壁形成致密的细胞层, 细胞密度有所下降。经计算其群体倍增时间为 43.048 h , 说明剑尾鱼脑细胞系细胞生长状态依然良好。

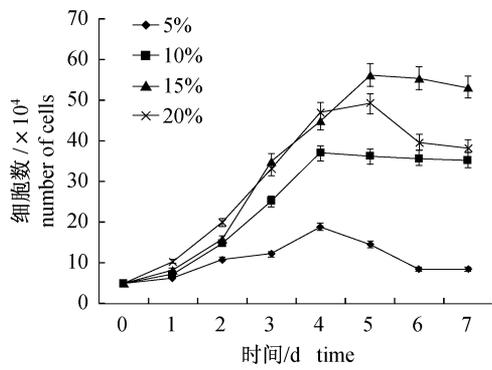


图2 SFB在DMEM/F-12 + L-15(1:1)培养液中对不同血清浓度的选择

Fig. 2 Growth curves of SFB in DMEM/F-12 + L-15(1:1) medium supplemented with different concentrations of FBS

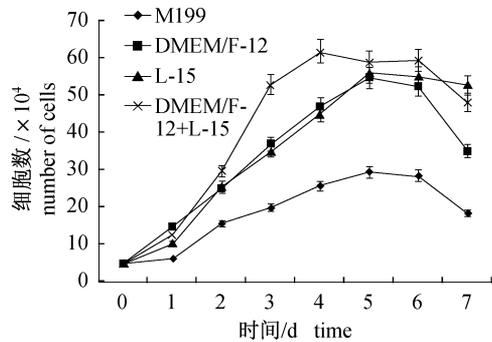


图3 SFB在添加10%FBS下对不同培养基的选择

Fig. 3 Comparative growth of SFB in selected growth medium supplemented with 10% FBS

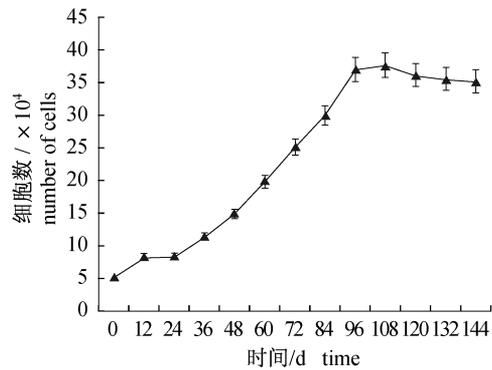


图4 第65代剑尾鱼脑细胞的生长曲线

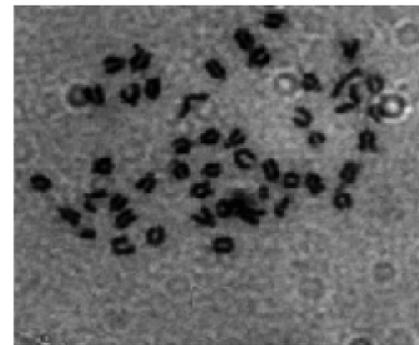
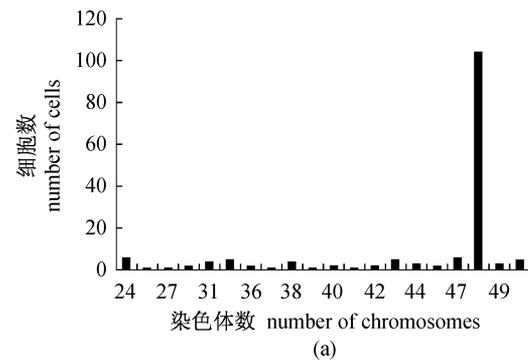
迟缓期. 0 ~ 24 h; 对数生长期. 24 ~ 96 h; 平稳期. 96 ~ 120 h; 衰退期. 120 ~ 144 h。

Fig. 4 The growth curve of SFB cells at passage 65 lag phase. 0 - 24 h; logarithmic phase. 24 - 96 h; stationary phase. 96 - 120 h; decline phase. 120 - 144.

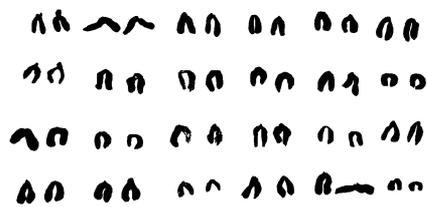
2.3 剑尾鱼脑细胞系的染色体分析

对第65代的SFB进行染色体计数。在统计

的160个分裂相中,染色体数目分布在24~50条之间,其中有65%的正常二倍体细胞具有48条染色体(图5),SFB核型公式为 $2n = 2st + 46t$,臂指数(NF) = 48,与剑尾鱼的体染色体特征吻合^[3]。



(b)



(c)

图5 剑尾鱼脑细胞系的染色体分析

(a)第65代SFB的染色体分析;(b)第65代SFB系的中期染色体,1 000 x;(c)第65代SFB系的染色体组型。

Fig. 5 Chromosome analysis of brain cell line from *X. helleri*

(a) chromosome analysis of SFB at 65th; (b) chromosome of SFB at 65th during metaphase (Giemsa stain). Magnification, 1 000 x; (c) the karyotype of SFB.

2.4 苯并(a)芘对剑尾鱼脑细胞CYP1A mRNA表达的影响

10^{-8} mol/L 苯并(a)芘胁迫下便可明显诱导CYP1A基因的表达($P < 0.05$),而CYP1A mRNA表达量最高值出现在最高浓度诱导组 10^{-5} mol/L

($P < 0.01$),其表达量为对照组的9 253.234倍(图6)。因而,苯并(a)芘对 *CYP1A* 基因的相对表达量的诱导极其显著,且存在较好的剂量-效应关系。

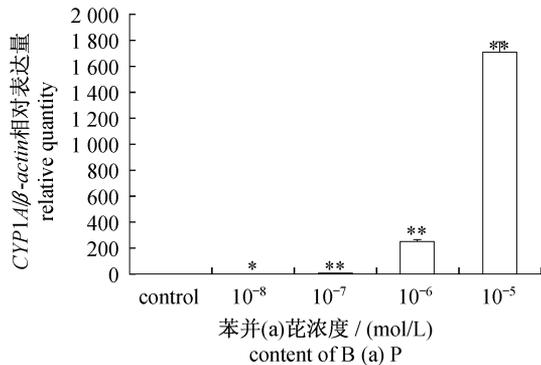


图6 不同浓度苯并(a)芘暴露 SFB 24 h *CYP1A* 基因表达结果

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Fig. 6 *CYP1A* gene expression in SFB in B(a)P exposed groups

3 讨论

3.1 SFB 生长特性

细胞系建立过程中,原代细胞的培养是基础。为了克服原代细胞难贴壁的现象,本实验采用控制酶消化时间、原瓶传代等方法使原代细胞尽快适应体外培养环境,获得了可稳定传代的细胞系,且已传至 90 代。L-15、DMEM、DMEM/F-12、M199 等都是鱼类细胞培养的常用培养液^[5-9],在本研究中发现,剑尾鱼脑细胞系可在多种培养液中传代,而 DMEM/F-12 和 L-15 两种等比混合最适合细胞生长,细胞增殖速度也快,可应用于后续应用中。血清中的成分比较复杂,且对于绝大部分体外培养的细胞是必须的,大多鱼类细胞均需添加血清^[10-13]。为了解不同血清浓度对剑尾鱼脑细胞生长的影响,试验选用了 5%~20% 4 个梯度血清浓度的培养液,发现细胞在 15% 血清浓度时生长最好,并非浓度越高越好,而 10% 血清也可满足剑尾鱼脑细胞的生长,在使用上可节约部分成本。

3.2 SFB 染色体核型分析

染色体是细胞遗传学的基础,其核型已成为种属鉴定的重要的指标。离体条件下,许多传代细胞容易发生多倍体化或非整倍体化现象,故染色体组型也是鉴定细胞系是否发生转化的可靠指

标^[10]。目前常采用秋水仙素来阻碍纺锤丝形成,从而使染色体停留在有丝分裂的中期。秋水仙素的浓度和时间选择对于能否获得清晰的染色体中期分裂相非常重要。本实验采用秋水仙素终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,于 27 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 4 h,获得了较多中期染色体,染色体形态也比较理想,其条件与耿晓芬^[11]测定大菱鲆细胞系染色体的方法相仿。染色体分析结果表明,剑尾鱼脑细胞系为正常的二倍体细胞,特征性染色体数目为 48 条,核型公式与剑尾鱼染色体数目分析研究的报道一致,证明所建细胞系确为剑尾鱼脑二倍体细胞系。

3.3 苯并(a)芘对 SFB 中 *CYP1A* 基因的诱导效应

工农业的快速发展给环境带来越来越大的压力,环境问题一直是倍受关注的焦点,因而,不同领域对毒理学研究的发展和深入有客观上要求。剑尾鱼在水环境污染监测中已得到良好应用,若要作为代表物种系统发展,体外的相关研究必不可少。原代细胞刚从组织中分离,与体内原组织在形态结构和功能活动上相似性大,适合进行药物测试研究。细胞系由于长时间的继代培养,细胞功能特化,有些已失去了原组织所具功能。试验表明,本研究获得的细胞系还具有 I 相解毒代谢酶功能。鱼类是水环境污染监测的重要生物,有多个鱼类细胞系应用于水污染监测中,如杂交鲟(尖齿胡鲟×斑点胡鲟)细胞系、罗非鱼鳃上皮细胞^[14]、鲑胚胎细胞系、鲤内皮瘤细胞系、虹鳟生殖腺细胞系、牙鲆血细胞^[15]、牙鲆鳃细胞^[16]、草鱼细胞系^[17]等,为鱼类的系统应用提供基础。

细胞色素 P450 酶是混合功能氧化酶系中最重要的一族,参与众多药物在动物体内的生物转化。*CYP1A* 主要参与多环芳香烃类化合物的代谢,在正常鱼体组织中的浓度很低,但在某些外来化学物质特别是 PAHs 的诱导下,它的活性异常增高。PAHs 化合物如苯并(a)芘对 *CYP1A* 基因表达的诱导能力极强,对 *CYP1A* 的诱导能力越大,往往意味着具有更大的生态毒性^[18]。因此,鱼类 *CYP1A* 基因作为生物标志物已广泛应用于环境毒理学研究中^[4,13-14]。细胞系对污染物的反应均一性好、条件易于控制、可重复性强,作为环境污染和毒物检测工具有广阔的应用前景,对于环境评估和检测有重要意义。

参考文献:

- [1] Kienzler A, Tronchère X, Devaux A, *et al.* Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay [J]. *Toxicology in Vitro*, 2012, 26(3): 500–510.
- [2] Araujo C S, Marques S A, Carrondo M J, *et al.* *In vitro* response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout RTG-2 cell lines to benzo(a) pyrene [J]. *The Science of the Total Environment*, 2000, 247(2–3): 127–135.
- [3] 吴淑勤, 黄志斌. 水生实验动物—剑尾鱼[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 3–5.
- [4] Liang X M, Nie X P, Ying G G, *et al.* Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach [J]. *Chemosphere*, 2003, 90(3): 1281–1288.
- [5] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos [J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1–4): 141–151.
- [6] Wen C M, Cheng Y H, Huang Y F, *et al.* Isolation and characterization of a neural progenitor cell line from tilapia brain [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 149(2): 167–180.
- [7] 马陶武, 王子健, 易浪波. 稀有鮎鲫和日本青鳞肝细胞原代培养及其对2,3,7,8-TCDD的敏感性比较 [J]. *环境科学学报*, 2010, 30(6): 1243–1249.
- [8] 赵中辛, 周主青. 高温对罗非鱼肝细胞原代培养的影响 [J]. *中外实验外科杂志*, 2006, 23(6): 678–680.
- [9] 薛淑群, 尹洪滨. 鲤鱼尾鳍细胞的体外培养及其生长状态的研究 [J]. *水产学杂志*, 2003, 16(2): 40–43.
- [10] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 1版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] 耿晓芬. 大菱鲆细胞系的建立[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [12] 付思思, 吴志新, 王敏, 等. 锦鲤组织细胞体外培养的初步研究 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2012, 42(3): 44–49.
- [13] Beijer K, Abrahamson A, Brunström B, *et al.* CYP1A inhibition in fish gill filaments; A novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 96(2): 145–150.
- [14] Zhou B, Liu W, Wu R S, *et al.* Cultured gill epithelial cells from tilapia (*Oreochromis niloticus*): a new *in vitro* assay for toxicants [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 71(1): 61–72.
- [15] Woo S, Kim S, Yim S, *et al.* Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2006, 52(12): 1768–1775.
- [16] Na N, Guo H R, Zhang S C, *et al.* *In vitro* and *in vivo* acute toxicity of fenpyroximate to flounder *Paralichthys olivaceus* and its gill cell line FG [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 92(2): 76–85.
- [17] 林茂, 杨先乐, 纪荣兴, 等. 草鱼体外培养细胞中β-萘黄酮对CYP1A基因表达的诱导 [J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 865–870.
- [18] Billiarda S M, Bolsb N C, Hodson P V. *In vitro* and *in vivo* comparisons of fish specific CYP1A induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59(3): 292–299.

Development of a brain cell line from swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) and the inducible expression for cytochrome P4501A

WANG Yingying, LI Kaibin, LIU Chun, WANG Qing, ZENG Weiwei, SHI Cunbin, WU Shuqin*
(Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology,
Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The aim of this study was to establish the swordtail fish, *Xiphophorus helleri*, brain cell line SFB (swordtail fish brain cell line) and to study its CYP1A mRNA inductive effect. Primary brain cell culture of swordtail fish was initiated by trypsin digestion methods, and a stable brain cell line was obtained successfully after culture and proliferation. The optimal culture medium for SFB was Leibovitz-15 to blend DMEM/F12 medium with 1:1 supplemented with 15% fetal bovine serum, and the optimal culture conditions for SFB were 27 °C and 5% CO₂. The SFB grew actively under the optimal medium and culture conditions, and the doubling time is 43.048 hours at 65th passage. And chromosome analysis showed that the SFB exhibited chromosomal diploidy with a modal chromosome number of 48, the karyotype formula was $2n = 2st + 46t$, $NF = 48$, which are consistent with the swordtail fish. The cells maintained their original shape and high viability after being cryopreserved and resuscitated. The induction experimental results showed that, the expression of CYP1A mRNA in B(a)P-treated (10^{-8} – 10^{-5} mol/L) SFB cells increased significantly, and increased along with the increasing dosage of B(a)P. A dose-dependent relationship between the levels of CYP1A mRNA expression and doses of B(a)P was observed. Thus, the establishment of this cell line will provide convenience for the toxicological evaluation and a basis for its application to ecological toxicology.

Key words: *Xiphophorus helleri*; brain cell line; cytochrome P4501A

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com